

学校编码: 10384
学号: 21620110153938

分类号____密级____
UDC____

厦门大学
博 士 学 位 论 文

多环芳烃的心脏与视觉发育毒性效应及机制研究

Cardiac and ocular developmental toxicities of PAHs: the
mechanisms involved

指导教师姓名: 王重刚 教授

专 业 名 称: 分子与细胞生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

多环芳烃的心脏与视觉发育毒性效应及机制研究

指导教师: 王重刚 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
CONTENTS	VI
摘要	XI
ABSTRACT	XIV
第一章 前言	1
1.1 人类出生缺陷的研究现状	1
1.1.1 人类出生缺陷的病发情况	1
1.1.2 人类出生缺陷的诱因	2
1.2 PAHs 污染及研究现状	3
1.2.1 PAHs 的理化特性	4
1.2.2 PAHs 的污染现状	4
1.3 PAHs 的毒性效应及机制研究进展	8
1.3.1 致癌性、致畸性、致突变性	8
1.3.2 胚胎发育毒性	10
1.3.3 其他毒性	12
1.4 斑马鱼心脏与视觉系统的发育过程和调控机制	12
1.4.1 斑马鱼心脏发育过程	12
1.4.2 鱼类心脏发育的调控机制	14
1.4.3 斑马鱼视觉系统发育过程和调控机制	14
1.5 心肌肥大的特征性指标与分子机制	18
1.6 PAHs 对心脏与视觉系统发育的影响及研究进展	21
1.6.1 PAHs 对心脏发育的影响及研究进展	21
1.6.2 PAHs 对视觉系统发育的影响及研究进展	22
1.7 本研究的内容、目的和意义	23

第二章 材料与方法	25
2.1 实验材料	25
2.2 主要仪器	25
2.3 主要药品与试剂	26
2.4 合成及测序	26
2.5 主要试剂配制	26
2.5.1 斑马鱼胚胎收集培养以及成年斑马鱼培养所需主要溶液	26
2.5.2 大肠杆菌感受态制备相关溶液	27
2.5.3 大肠杆菌培养培养基	27
2.5.4 质粒提取所需主要溶液	27
2.5.5 Western blot 分析所需主要溶液	27
2.5.6 石蜡切片及 HE 染色所需主要溶液	28
2.5.7 EMSA 所需主要溶液	28
2.5.8 ChIP 所需主要溶液	28
2.5.9 Masson 三色染色法所需主要溶液	28
2.5.10 DNA 片段胶回收及克隆所需主要溶液	28
2.5.11 TUNEL 需主要溶液	28
2.5.12 EdU 所需主要溶液	28
2.5.13 基因组 DNA 提取所需主要溶液	29
2.6 主要实验方法	29
2.6.1 斑马鱼毒物暴露实验	29
2.6.2 斑马鱼心脏发育过程中相关形态学和功能等指标的毒性效应观察	30
2.6.3 斑马鱼视觉系统发育过程中相关形态学和功能等指标的毒性效应观察	30
2.6.4 大鼠毒物暴露实验	31
2.6.5 H9C2 细胞培养及暴露实验	31
2.6.6 HepG2 细胞培养及暴露实验	31
2.6.7 石蜡包埋及染色	31
2.6.8 基因芯片筛选差异基因	32

2.6.9 组织总 RNA 提取	32
2.6.10 1st cDNA 合成	33
2.6.11 PCR 扩增	34
2.6.12 纯化回收片段与载体的连接	34
2.6.13 感受态大肠杆菌的制备	34
2.6.14 片段 DNA 连接质粒后转化	35
2.6.15 实时荧光定量 PCR 分析	35
2.6.16 Western blot	40
2.6.17 TUNEL	40
2.6.18 EdU	41
2.6.19 EMSA	41
2.6.20 ChIP	43
2.6.21 miRNA RT-PCR 分析	45
2.6.22 基因组 DNA 的提取	46
2.6.23 全基因组 DNA 甲基化水平检测	46
2.6.24 全基因组 DNA 亚硫酸氢盐转化	47
2.6.25 高分辨率熔解曲线法检测甲基化水平	48
2.7 数据处理	49
第三章 结果分析	50
3.1 PAHs 的心脏发育毒性效应及机制	50
3.1.1 BaP 暴露对斑马鱼胚胎心脏发育的影响	50
3.1.1.1 BaP 暴露对心脏形态形成的影响	50
3.1.1.2 BaP 暴露对心脏功能的影响	51
3.1.1.3 BaP 暴露对斑马鱼胚胎心脏发育及功能相关基因表达水平的影响	56
3.1.2 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼心脏的影响	61
3.1.2.1 BaP 暴露对成年斑马鱼心体比和心脏中纤维含量的影响	61
3.1.2.2 BaP 暴露对成年斑马鱼心肌肥大分子标志物表达水平的影响	63
3.1.2.3 BaP 暴露对成年斑马鱼心脏中心肌肥大关键调控因子表达水平的影响	64

3.1.3 Phe 暴露对新生大鼠心脏发育的影响	66
3.1.3.1 Phe 暴露对新生大鼠心脏形态和组织学水平的影响	66
3.1.3.2 Phe 暴露对 H9C2 细胞形态的影响	69
3.1.3.3 Phe 暴露对 H9C2 细胞蛋白合成水平的影响	72
3.1.3.4 Phe 暴露对心肌肥大分子标志物表达水平的影响	73
3.1.3.5 Phe 暴露对心肌肥大关键调控因子表达水平的影响	76
3.1.3.6 Phe 暴露对全基因组甲基化水平的影响	79
3.1.3.7 Phe 暴露对 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 表达水平的影响	79
3.1.3.8 Phe 暴露对 miR-133a 启动子序列甲基化水平的影响	81
3.1.3.9 DNMT 抑制剂缓解 Phe 暴露对 H9C2 细胞形态以及关键基因的影响	82
3.2 PAHs 的视觉发育毒性效应及机制	85
3.2.1 Phe、Py、BaP 暴露对斑马鱼胚胎视觉发育毒性的比较研究	85
3.2.1.1 Phe、Py、BaP 暴露对视觉系统形态形成的影响	85
3.2.1.2 Phe、Py、BaP 暴露对视觉系统功能的影响	94
3.2.1.3 Phe、Py、BaP 暴露对视觉系统发育或疾病相关调控基因转录水平的影响	96
3.2.2 Phe 暴露对斑马鱼胚胎视觉系统发育影响的机制	103
3.2.2.1 Phe 暴露对视网膜细胞凋亡的影响	103
3.2.2.2 Phe 暴露对视网膜 caspase-3 活性的影响	104
3.2.2.3 Phe 暴露对视网膜细胞增殖的影响	105
3.2.2.4 Phe 暴露对视网膜 PCNA 表达水平的影响	107
3.2.2.5 Phe 暴露对 Zeb1、Mitfa、Pax6 等视觉发育关键调控基因表达的影响	108
3.2.2.6 TF Search 预测 Zeb1 上游转录因子	109
3.2.2.7 Phe 暴露对 Zeb1 潜在转录因子 AhR 表达的影响	109
3.2.2.8 EMSA 与 ChIP 证实 AhR 为 Zeb1 转录因子	110
3.2.2.9 AhR 抑制剂缓解 Phe 暴露对 Zeb1、Mitf 等视觉发育关键调控基因表达的影响	111

第四章 讨论	113
4.1 PAHs 的心脏发育毒性效应及机制	113
4.1.1 BaP 暴露引发斑马鱼胚胎心脏发育畸形和心脏功能障碍	113
4.1.2 BaP 暴露对斑马鱼胚胎心脏发育及功能相关基因的表达水平的影响	113
4.1.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼心脏的影响	115
4.1.4 胚胎时期低剂量 BaP 暴露影响成年斑马鱼心脏的分子机制	116
4.1.5 Phe 暴露对新生大鼠心脏发育的影响	117
4.1.6 Phe 暴露导致大鼠心肌肥大的分子机制	117
4.2 PAHs 的视觉发育毒性效应及机制	118
4.2.1 Phe、Py、BaP 暴露引发视觉系统发育畸形和功能障碍	118
4.2.2 Phe、Py、BaP 暴露造成斑马鱼胚胎视觉系统发育障碍的分子机制	119
4.2.3 Phe、Py、BaP 暴露引发视觉发育毒性差异的可能原因	122
4.2.3.1 Phe、Py、BaP 在斑马鱼体内的富集	122
4.2.3.2 视网膜对 Phe、Py、BaP 的通透性差异	122
4.2.3.3 Phe、Py、BaP 经由干扰 AhR 内源性配体引发差异毒性	123
4.2.3.4 Phe、Py、BaP 经由视黄酸受体调控视觉发育毒性	125
第五章 结论	127
5.1 本研究所取得的主要结果	127
5.2 本研究的创新点	128
5.3 展望	129
参考文献	131
缩略词对照表	152
攻读博士阶段发表的论文和参加的课题	153
致 谢	154

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	XI
Abstract (In English)	XIV
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The study of human birth defects	1
1.1.1 The situation of human birth defects	1
1.1.2 The inducers of human birth defects	2
1.2 The study of PAHs pollution	3
1.2.1 The characters of PAHs	4
1.2.2 The pollution study of PAHs	4
1.3 The toxicities of PAHs	8
1.3.1 Carcinogenicity	8
1.3.2 Development toxicity	10
1.3.3 others	12
1.4 The process of cardiac and ocular development in fish and its mechanism ..	12
1.4.1 The process of heart development in zebrafish	12
1.4.2 The mechanisms of heart development in fish	14
1.4.3 Process of ocular development in zebrafish and mechanisms involved	14
1.5 Markers and molecular mechanisms of cardiac hypertrophy	18
1.6 The effects of PAHs on cardiac and ocular development	21
1.6.1 The effects of PAHs on cardiac development	21
1.6.2 The effects of PAHs on ocular development	22
1.7 Research objectives and significance	23
Chapter 2 Materials and methods	25
2.1 Materials	25
2.2 Apparatus	25

2.3 Main regents	26
2.4 Sequencing	26
2.5 Solutions	26
2.6 Methods	29
2.6.1 Zebrafish exposure experiment	29
2.6.2 Assessment of cardiac toxicity	30
2.6.3 Assessment of ocular toxicity	30
2.6.4 Rat exposure experiment	31
2.6.5 H9C2 cell culture and the exposure experiment	31
2.6.6 HepG2 cell culture and the exposure experiment	31
2.6.7 Paraffin-embedded, section and staining	31
2.6.8 Microarray	32
2.6.9 Total RNA extraction	32
2.6.10 cDNA synthesization	33
2.6.11 PCR	34
2.6.12 DNA gel extraction and ligation	34
2.6.13 Preparation of competent cell	34
2.6.14 Transformation	35
2.6.15 Realtime-PCR assay	35
2.6.16 Western blot analysis	40
2.6.17 TUNEL	40
2.6.18 EdU	41
2.6.19 EMSA	41
2.6.20 ChIP	43
2.6.21 miRNA RT-PCR	45
2.6.22 Global DNA extraction	46
2.6.23 Global DNA methylation Quantification	46
2.6.24 Global DNA conversion	47
2.6.25 High Resolution Melt	48
2.7 Data analysis	49

Chapter 3 Results	50
3.1 Cardiac developmental toxicities of PAHs and the mechanisms involved ...	50
3.1.1 Effects of BaP on cardiac development of zebrafish embryos.....	50
3.1.1.1 Effects of BaP on heart morphology.....	50
3.1.1.2 Effects of BaP on cardiac function.....	51
3.1.1.3 Effects of BaP on genes related to cardiac development and function	56
3.1.2 Effects of Bap exposure during embryonic development on adult zebrafish heart.....	61
3.1.2.1 Effects of BaP on the heart weight to body weight (%) ratios and the area of cardiac fibrosis in adult zebrafish	61
3.1.2.2 Effects of BaP on the markers of cardiac hypertrophy	63
3.1.2.3 Effects of BaP on the key regulators of cardiac hypertrophy.....	64
3.1.3 Effects of Phe on heart development of new born rat.....	66
3.1.3.1 Effects of Phe on the heart of new born rat at morphological and histological level	66
3.1.3.2 Effects of Phe on the morphology of H9C2 cells	69
3.1.3.3 Effects of Phe on the level of protein synthesis in H9C2 cells	72
3.1.3.4 Effects of Phe on the markers of cardiac hypertrophy	73
3.1.3.5 Effects of Phe on the key regulators of cardiac hypertrophy	76
3.1.3.6 Effects of Phe on the global DNA methylation level	79
3.1.3.7 Effects of Phe on DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b.....	79
3.1.3.8 Effects of Phe on the methylation level of CpG sites located at the putative transcription start sites of the miR-133a loci.....	81
3.1.3.9 DNMT inhibitor alleviated the effects of Phe	82
3.2 Ocular developmental toxicities of PAHs and the mechanisms involved.....	85
3.2.1 Effects of Phe, Py, and BaP on ocular development in zebrafish	85
3.2.1.1 Effects of Phe, Py, and BaP on eye morphology	85
3.2.1.2 Effects of Phe, Py, and BaP on ocular function	94

3.2.1.3 Effects of Phe, Py, and BaP on the genes related to ocular development, function, and diseases	96
3.2.2 Mechanisms involved in the ocular toxicity caused by Phe	103
3.2.2.1 Effects of Phe on cell apoptosis in retina	103
3.2.2.2 Effects of Phe on caspase-3 activity in retina	104
3.2.2.3 Effects of Phe on cell proliferation in retina	105
3.2.2.4 Effects of Phe on PCNA expression	107
3.2.2.5 Effects of Phe on Zeb1, Mitfa, and Pax6 expression	108
3.2.2.6 Prediction of transcription factors of Zeb1	109
3.2.2.7 Effects of Phe on AhR expression	109
3.2.2.8 EMSA and ChIP	110
3.2.2.9 AhR inhibition alleviate the effects of Phe on Zeb1 and Mitf	111
Chapter 4 Discussion	113
4.1 Cardiac developmental toxicities of PAHs and the mechanisms involved ..	113
4.1.1 Embryonic exposure of BaP induced cardiac defects and dysfunction	113
4.1.2 Exposure of BaP disturbed the expression of cardiac development and function relevant genes	113
4.1.3 Effects of Bap exposure during embryonic development on adult zebrafish heart	115
4.1.4 Mechanisms involved in the effects of Bap exposure during embryonic development on adult zebrafish heart	116
4.1.5 Effects of Phe on the heart of new born rat	117
4.1.6 Mechanisms involved in the cardiac hypertrophy caused by Phe	117
4.2 Ocular developmental toxicities of PAHs and the mechanisms involved	118
4.2.1 Effects of Phe, Py, and BaP on ocular development in zebrafish	118
4.2.2 Mechanisms involved in the effects of Phe, Py, and BaP on ocular development in zebrafish	119
4.2.3 Possible reasons of different effects on ocular development in zebrafish	

caused by Phe, Py, and BaP	122
4.2.3.1 Accumulation of Phe, Py, and BaP in zebrafish embryos	122
4.2.3.2 Different diffusion characters of Phe, Py, and BaP of intraretinal layers	122
4.2.3.3 Phe, Py, and BaP induced different effects on ocular development in zebrafish through perturbations on endogenous ligands of AhR	123
4.2.3.4 Phe, Py, and BaP induced different effects on ocular development in zebrafish through perturbations on RAR	125
Chapter 5 Conclusions	127
References	131
Abbreviation	152
Publications and Projects	153
Acknowledgement	154

摘要

人类出生缺陷已经成为当今世界各国最为重视的卫生问题。多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类广泛分布于环境中的持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs), 具有胚胎发育毒性, 与人类出生缺陷密切相关。

目前为止, 关于 PAHs 心脏毒性的研究大多集中于高浓度急性暴露毒性, 而对于环境浓度下的 PAHs 暴露是否能引起同样的心脏发育毒性, 研究甚少; 同时, 低环数的 PAHs, 例如 Phe 的心脏发育毒性机制的研究尚不明朗; 并且, 关于胚胎时期短暂的低浓度 PAHs 暴露对成年后心脏功能的影响的相关研究还很少。

流行病学研究的数据表明, 视觉系统先天畸形与环境中 PAHs 污染之间可能存在联系, 但其机制并不明确。

因此本研究选取 2 种不同环数的 PAHs: BaP (5 环) 和 Phe (3 环), 利用斑马鱼, 大鼠和 H9C2 细胞系三种实验模型, 在环境水平暴露下, 应用生态毒理学, 生物信息学和分子生物学技术检测 PAHs 对心脏发育的毒性作用效应, 比较分析其可能的作用机制。

本研究拟采用斑马鱼作为实验模式动物, 研究不同环数的 PAHs (Phe, Py, BaP) 的视觉发育毒性效应, 比较不同环数 PAHs 对视觉发育的毒性大小, 理解它们的作用途径和机制。

我们的结果显示:

1) 环境浓度的 BaP 暴露能导致一系列的心脏畸形, 主要表现为心包囊水肿、心房狭窄、心脏管状化、心房与心室重叠减少、心脏拉长, 且心脏畸形程度和畸形率随着暴露浓度的升高而上升。除了这些形态上的畸形, BaP 暴露同样能导致斑马鱼胚胎心脏功能异常, BaP 暴露能引起斑马鱼胚胎心率徐缓, 心率不齐, 心输出量下降。BaP 暴露可引起 EDV 和 ESV 的同时下降, 预示着 BaP 暴露能导致斑马鱼胚胎的心脏收缩和舒张能力都下降。由此可见, BaP 暴露深刻的影响了心脏的功能和效率。利用基因芯片技术, 结合 CTD 数据库以及 MAS 3.0, 我们共得到 57 个与心血管发育, 心血管疾病或 BaP 代谢相关的基因, 并利用 cytoscape 2.6.2 与 NCBI 数据库连接, 鉴定这 57 个基因之间的关系, 绘制了一个 predicted gene network。我们相信, 这个 predicted gene network 将为探索 BaP 心脏发育毒

性的分子机制提供新的线索和研究思路。

2) BaP 暴露导致成年斑马鱼心体比显著上升, 心肌细胞间质中的纤维含量呈剂量依赖性上升。同时, 接受过 BaP 暴露的成年斑马鱼的 ANP, BNP 和 c-Myc 等分子标志物的表达水平都显著上升。由此可见, 胚胎时期低剂量 BaP 暴露可以引发成年斑马鱼发生类似心肌肥大的病变。其机制可能是经由上调 Rac1, RhoA, 和 cdc42 的表达, 以及激活 ERK1/2 引起的。

3) Phe 暴露能引起大鼠心脏显著增大, 心体比显著上升, 心肌细胞体积增加, 心肌细胞间质中纤维含量上升。同时, 我们证明, Phe 暴露能导致 H9C2 细胞体积增大, 蛋白合成水平上升, 导致 H9C2 细胞和大鼠心脏内 ANP、BNP 以及 c-Myc 等心肌肥大分子指标显著上升。因此, 本研究在体内和体外模型上均证实了 Phe 暴露能导致心肌肥大。其机制可能是 Phe 经由诱导 miR-133a 上游启动子序列的甲基化, 进而抑制 miR-133a 的表达, 从而促进 cdc42 和 RhoA 的表达, 最终引发心肌肥大相关的形态学建成和基因表达模式改变。

4) 不同浓度的 Phe、Py、BaP 暴露后, 斑马鱼胚胎具有正常的触碰反应, 且头部大小和体长均没有显著变化。行为学实验证明, Phe、Py、BaP 暴露组均对光的敏感性下降, 这预示着三种 PAHs 暴露均已对斑马鱼视网膜的感光机能造成损伤。

5) 不同浓度的Phe暴露均能引起斑马鱼胚胎小眼畸形, 眼睛长短轴的长度缩短, 且畸形程度表现出剂量依赖效应。此外, Phe暴露对斑马鱼视网膜发育产生了明显的抑制效应: a) 直至72 hpf, 中、高浓度组大部分仔鱼尚未观察到INL、IPL、GCL等的分化, 远远落后于其他器官系统的发育进度; b) 低浓度组虽然大部分已能观察到各层次分化, 但其厚度明显较对照组薄; c) 中、高浓度组视网膜细胞排列较对照组松散。Phe暴露组的视网膜总厚度、RPE厚度、GCL层厚度以及晶状体直径均减小, 且表现出剂量依赖效应。

与Phe相比, Py和BaP暴露并未对斑马鱼胚胎的眼睛尺寸造成显著影响, 也没有对视网膜内部层次的发育分化表现出像Phe那样的显著抑制效应, 各层次清晰, 但随着浓度升高, 最外层的GCL的细胞排列越发松散。Py暴露组的视网膜总厚度和GCL层厚度仅在最高浓度组表现出显著效应。RPE厚度以及晶状体直径均未表现出显著差异。BaP暴露组的各层次厚度以及晶状体直径均未表现出显著差

异。因此，从形态学和组织学水平上的实验结果来看，三种PAHs都具有视觉发育毒性，其毒性大小为：Phe>Py>BaP。

6) 利用基因芯片技术，我们筛选出受Phe、Py、BaP干扰的视觉系统相关基因，主要涉及视上皮的成熟和分化，视觉系统的形成，光受体的存活与发育，视网膜的成熟和结构稳定，视网膜光能换能机制和信号转导，视网膜神经突触形成等功能和生物学过程。由此可见，三种PAHs的视觉发育毒性机制可能与视网膜发育分化和结构稳定相关基因的表达紊乱有关。同时，三种PAHs暴露后所筛选出的视觉系统相关的基因并不完全相同，因此，这三种PAHs引发视觉毒性的分子机制可能并不相同。

7) Phe 可能是经由 AhR-Zeb1-Mitf-Pax6 途径引起视网膜细胞凋亡水平上升和增殖水平下降，最终引发视觉发育和功能障碍。

关键词： 多环芳烃 斑马鱼 大鼠 H9C2 发育毒性 心脏 视觉 机制

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库